



© Gebrauchsmuster

U1

©

(11) Rollennummer G 86 07 324.9

(51) Hauptklasse G01N 30/60

Nebenklasse(n) G01N 30/48 G01N 35/00

G01N 33/53 G01N 33/563

C12Q 1/00

(22) Anmeldetag 17.03.86

(47) Eintragungstag 30.06.88

(43) Bekanntmachung
im Patentblatt 11.08.88

(54) Bezeichnung des Gegenstandes
Chromatographische Säule für immunologische
Untersuchungsverfahren

(71) Name und Wohnsitz des Inhabers
Gilak, Armin, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 5309
Meckenheim, DE

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters
Deufel, P.,
Dipl.-Chem.Dipl.-Wirtsch.-Ing.Dr.rer.nat; Schön,
A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Hertel, W.,
Dipl.-Phys.; Lewald, D., Dipl.-Ing.; Otto, D.,
Dipl.-Ing. Dr.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

Q 6253
161

10.06

-1-

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine chromatographische Säule für immunologische Untersuchungsverfahren.

Mit einer solchen chromatographischen Säule sollen Separationsverfahren für immunologische Bestimmungen, insbesondere fluoreszenz-, enzym- oder lumineszenz-immunologische Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex von den freien, nicht am Antikörper gebundenen Antigenen mit Hilfe der trockenen chromatographischen Säule getrennt wird, welcher das flüssige Reaktionsgemisch der immunologischen Bestimmung aufgegeben wird und wobei die Antigen-Antikörper-Komplex-Lösung extinktionphotometrisch gemessen wird.

Seitdem 1960 S.A. Berson, R.S. Yalam und R. Ekins das Prinzip des Ligandenbindungsassays gefunden haben, haben der Radioimmunassay und seine Abkömmlinge als Methode der Wahl zur quantitativen Bestimmung kleinsten Substanzmengen in biologischem Material, Lebensmitteln u. ä. eine weite Verbreitung erfahren. Nachteile dieser Methode sind offensichtlich der Umgang mit Radioisotopen sowie deren begrenzte Haltbarkeit, die vor allem auch ihre Nutzung in Ländern der Dritten Welt beeinträchtigt, in denen die Versorgung und Entsorgung durch kommerzielle Kit-Hersteller nicht der in industriellen Ländern vergleichbar ist.

Als alternative Methoden wurden Enzym-Immunoassays, Fluoreszenz-Immunoassays oder Lumineszenz-Immunoassays entwickelt, wobei die Bestimmung extinktionphotometrisch erfolgt.

8607321

11.10.86

-2-

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine besonders preiswerte und einfach zu handhabende chromatographische Säule für solche Untersuchungsverfahren vorzuschlagen, die in besonders einfacher und zuverlässiger Weise Reaktionen, Trennung und Messung der zu untersuchenden Substanzen ermöglicht.

Bei den bekannten universell anwendbaren Trenntechniken, wie dem Solid-Phase-System, war bisher beim Lumineszenzverfahren durch ein Ansetzen von Partikeln, besonders beim Coated-Tube-Assay, ein schwer zu eliminierender Background in Kauf zu nehmen, weil verfälschende Substanzen an der Röhrchenwand absorbiert wurden und erhebliche Spülvorgänge notwendig waren.

Handelte es sich bisher um radioimmunologische Separationsverfahren, so blieb das Problem der Entsorgung der radioaktiven Flüssigkeit, was neben dem Zeitaufwand vor allen Dingen eine Kontaminationsgefahr mit sich brachte.

Demgegenüber wird erfindungsgemäß die oben genannte Aufgabe bei einer trockenen chromatographischen Säule zum Separieren der Antigen-Antikörper-Komplexe von den freien, nicht an Antikörper gebundenen Antigenen und/oder zur vollständigen Bindung aller markierten Substanzen bei der immunologischen Bestimmung von Antigenen bzw. Haptenen nach radio-, fluoreszenz-, lumineszenz oder enzym-immunologischen Bestimmungsmethoden, bei der i.e. einer wasserfesten und wasserdichten Umhüllung als unpolares Säulenmaterial ein kreppförmiges dichtgerolltes Filterpapier mit hohem Reinheitsgrad, insbesondere aus Regeneratzellulose eingepreßt ist, dadurch erreicht, daß die chromatographische stehende Säule einen oberen Reaktionsteil und einen unteren Trenn- und Meßteil aufweist, die durch einen perforierbaren Boden voneinander getrennt sind.

Hierdurch wird erreicht, daß Reaktion einerseits, Trennung und Messung andererseits, in einer einzigen Säule und zwar gegebenenfalls ohne äußeren Kontakt durchgeführt werden können, das zu untersuchende Material, insbesondere das radioaktive Material, vollständig im Filter verbleibt und

0607324

17-10-66

-3-

in einfacherster Weise mittels eines Gamma-Counters bei radioimmunologischen Untersuchungen bzw. photometrisch bei lumineszenz-immunologischen Untersuchungen gemessen werden kann.

Als ein wichtiger erwünschter Nebeneffekt bei den radioimmunologischen Bestimmungen mit der erfindungsgemäßen Säule ist anzusehen, daß bei radioimmunologischen Bestimmungen das gesamte radioaktive Reaktionsgemisch in der Säule aufgesaugt verbleibt. Nach der Auszählung der Probeliegt somit die Radiokaktivität in einer bequemen handhabbaren Form vor; die Gefahr einer Kontamination mit Resten des flüssigen Reaktionsgemisches ist gegenüber den üblichen Verfahren stark gesenkt. Auch wenn der Antikörper stationär an eine Trägersubstanz innerhalb des Proberöhrchens gebunden ist, wird die gesamte flüssige Radioaktivität in der Säule absorbiert; dabei werden gleichzeitig die freien Antigene im oberen Säulenabschnitt gebunden.

Vorzugsweise wird die Filterpapiersäule von unten dicht an den perforierbaren Boden des oben aufschlagbaren Reaktionsteils herangesteckt. Hierdurch wird beim Perforieren bis in die Tiefe des Filterpapiers ein besonders wirksames Eindringen und ein ebensolches Adsorbieren erreicht. Zweckmäßig kann die Filterpapiersäule obeneine trichterartige Aufweitung haben, mit der sie im Klemmsitz unter den formähnlichen Boden der Säule gesteckt ist.

Das Filterpapier kann in eine Kunststoffhülse eingepreßt sein, die gegebenenfalls von einer metallischen Hülse, insbesondere aus verzinktem Kupfer, umgeben ist. Diese eignet sich als Abschirmmaterial bei extinktionsphotometrischen bzw. radioimmunologischen Messungen.

Die Perforierung kann von außen abgenommen werden. Es ist aber auch möglich, mit dem Boden in Berührung stehende Teile mit Zacken, Spitzen oder dergleichen auszustatten, die, etwa bei Druck auf die beiden Enden der Säule dann den Boden perforieren (geschlossenes System). Eine besondere Anwendung von Säule und Filter auf Automaten ist erfindungsgemäß

8607324

ebenfalls in Betracht gezogen. Hierbei werden zwei unten geschlossene röhrenartige Mikroküvetten nebeneinander angeordnet, wobei die erste als Reaktionsgefäß mit perforierbarem Deckel dient. Die zweite dient als Trenn- und Meßgefäß und enthält im oberen Abschnitt dicht eingepaßt in eine Kunststoffhülse das säulenartige Filterpapier, im unteren Abschnitt erfolgt die extinktionsphotometrische Messung. Statt der Verwendung von 2 Mikroküvetten ist auch eine einzige Vorrichtung denkbar, wobei oben der beschriebene Reaktionsteil mit perforierbarem Boden und unten der Trenn- und Meßteil angeordnet sind. Der Trennteil besteht aus der oben beschriebenen Filterpapiersäule, oben trichterförmig aufgeweitet und im Klemmsitz unter den Boden des Reaktionsteils gesteckt. Der Meßteil ist eine Mikroküvette, die von unten über die Kunststoffhülse des Reaktionsteils geschoben ist.

Bei dieser Ausführungsform ist es möglich, die Reagenzien mit Ausnahme der zu bestimmenden Substanz bei tiefen Temperaturen, insbesondere unterhalb -20°C, zu lyophilisieren.

Schließlich ist bei Einsatz der Maßnahme nach der Erfindung in Automaten möglich, alle Säulen durch einen einzigen Beaufschlagungsvorgang, manuell oder apparativ, perforierbar auszubilden. Die Beaufschlagung der Säule erfolgt, wie bei allen Weiterbildungen der Erfindung, von oben.

Eine besonders zweckmäßige wichtige Weiterbildung der Erfindung ist darin zu sehen, das kreppförmige Filtermaterial zur Erhöhung seiner Bindungsaffinität mit einer organischen Säure, insbesondere Malein- oder Oxalsäure oder gegebenenfalls einer Base, zu imprägnieren, und das Imprägniermittel wieder auszuwaschen. Dies verleiht dem wiedergetrockneten Papier durch eine gewisse Quellung der Fasern eine verbesserte Absorptionsfähigkeit und Differenzierung der Absorption.

8607324

Beispielsweise Ausführungsformen sollen nun mit Bezug auf die beiliegenden Zeichnungen näher erläutert werden, in denen

- Fig. 1 eine chromatographische Säule für das radioimmunologische Untersuchungsverfahren (Radio-Immuno-Assay -RIA);
Fig. 2 eine chromatographische Säule z.B. für fluoreszenz- oder lumineszenz-immunologische Untersuchungsmethoden;
Fig. 3 eine Ausführungsform mit Mikroküvette;
Fig. 4 / 5 Reaktionsgefäß und Meßgefäß für Automaten und
Fig. 6 eine weitere Ausführungsform zeigt.

Fig. 1 zeigt für radioimmunologische Bestimmungen ein Probenröhrchen 10, in das eine stehende chromatographische Säule 12 dicht eingeschoben ist, die etwa in der Mitte über einen Boden 14 verfügt. Die Säule mit Ausnahme des Filterpapiers und das Probenrörchen bestehen aus einem durchsichtigen Kunststoff, vorzugsweise aus Polyethylen. Der Boden 14 des Reaktionsgefäßes ist fest und abgedichtet bezüglich der Säule angebracht. Der Boden 14 ist bei 16 konisch oder trichterförmig nach unten ausgebildet und verfügt über eine dünne perforierbare Basis 18.

Durch die Konizität des Trichterbodens entsteht ein entsprechender Ringraum 20, der aus der Innenwand des geraden Säulenrohres und der Außenwand des trichterartigen Bodens gebildet ist und oben spitz zuläuft. Diese einfache Konstruktion wird ausgenutzt, um in unten zu beschreibender Weise eine Klemmverbindung zu ermöglichen.

Komplementär zu diesem Trichterboden verfügt der Filter- und Meßteil des Trenngefäßes über eine Hülse, die in einen komplementär trichterförmig aufgeweiteten Teil 22 übergeht. Die Hülse kann aus Metall, aber auch aus Kunststoff bestehen. In die Hülse ist dichteingepräst ein Filter 30 aus präpariertem Krepp-Papier, welches das eigentliche Säulenmaterial bildet. Es verfügt über eine Umhüllung 32 aus einem äußeren steifen

8607321

17.03.86

-6-

Kunststoff. Das Säulenmaterial kann aus Zellulose bestehen, die mit chemischen Imprägnierungsmitteln z.B. mit organischen Säuren, vorzugsweise Malein- oder Oxalsäure oder ggf. mit einer Base, vorbehandelt wurde. Das mit Hülse versehene Reaktionsrörchen wird in den Trichteransatz der Säule so eingesteckt, daß das Filter 30 den perforierbaren Boden kontaktiert.

Bei der erfindungsgemäßen Durchführung der Probenbestimmung werden die Reagenzien in den Reaktionsteil 13 pipettiert. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes am Ende der Inkubationszeit wird mit einem spitzen Gegenstand der trichterförmige Boden des Reaktionsteils von unten oder, bevorzugt von oben, perforiert und zwar ein gutes Stück in das Kreppfilter hinein. Das flüssige Reaktionsgemisch läuft durch den perforierten Boden in den säulenförmigen Filter. Dabei erfolgt die Trennung in der Form, daß die ungebundene Phase, d.h. die freien, nicht an Antikörper gebundenen Antigene im oberen Säulenabschnitt absorbiert werden, während die gebundene Phase, d.h. der Antigen/Antikörper-Komplex in den unteren Säulenabschnitt wandert. Sämtliche radioaktive Flüssigkeit wird von dem wasserdicht umhüllten Filterpapier aufgesogen und kann somit ohne Kontaminationsgefahr leicht entsorgt werden. Bei der Testdurchführung kann selbstverständlich das Rörchen mit einem Deckel 40 verschlossen werden. Durch das enge Anliegen des Filtermaterials am Boden des Reaktionsgefäßes und das durchgehende Durchstechen ist eine ausgezeichnete Benetzung des gesamten Säulenmaterials 30 gewährleistet. Andere Möglichkeiten der senkrechten Fixierung des Filterpapiers mit Hülse innerhalb der gesamten Säule sind selbstverständlich möglich, wie kleine Rippen an dem einen Teil, Ausnehmungen am anderen Teil, ein Ringwulst am trichterförmigen Boden und eine Ringnut an der aufgeweiteten Hülse etc.. Nachzutragen ist noch, daß der obere Säulenabschnitt, das Reaktionsgefäß 13, über einen aufgeweiteten Teil 36 (Passkragen) in das Hüllrohr 10 eingepaßt ist.

8607324

17.03.86

-7-

Fig. 2 zeigt ein Ausführungsbeispiel, insbesondere für lumineszenz-, fluoreszenz- und enzym-immunologische Untersuchungsverfahren. In einem Hüllrohr 50 wird eine ähnliche Konstruktion wie in Fig. 1 in Form einer Säule 52 mit satt gegen die Hüllrohrinnenseite einpassenden Säulenkopf 54 eingeschoben.

Handelte es sich bei der Konstruktion der Fig. 1 im wesentlichen bei der Hülsenaufweitung des langen Filters um Metall in relativ kurzer Ausbildung der Aufweitung, so ist für das Lumineszenzverfahren nur ein kurzes Stück Filter 56, gegebenenfalls mit Kunststoffaußenhülle, in einem beispielsweise langen metallischen Hülsenrohr 57 gehalten. Eine beispielsweise aus Kunststoff bestehende aufgeweitete Manschette 59 ist in ähnlicher Weise wie in Fig. 1 über den komplementären Trichterboden 58 der Säule gesteckt. Diesmal geht die aufgeweitete Hülse/Abschirmung 59 bis ganz oben an den zwischen der Innenseite des geraden Säulenrohrs und der Außenseite des trichterförmigen Bodens 58 gebildeten Zwischen- oder Ringraum und ist satt in diesem bei geringem Andruck enthalten. Auch das gegebenenfalls metallische und aus verzinktem Kupfer bestehende Hülsenrohr 57 für die Fixierung des Filters dient als Abschirmung. Nach der Darstellung ist die Säule unten schräg zugeschnitten, um ein Abtropfen der nur in geringen Mengen gegebenenfalls vorhandenen Flüssigkeit zwangsläufig sicherzustellen. Ausführungsformen ohne Abschirmung 59 sind möglich. Das Filterpapier kann auch in die Kapillarhülle eingepreßt werden. Zur fluoreszenz-immunologischen Untersuchung werden die Reagenzien in den Reaktionsteil 60 der chromatographischen Säule einschließlich der markierenden Substanz pipettiert. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichts wird der trichterförmige Boden des Reaktionsteils bis an das dicht darunter liegende Filterpapier perforiert und das flüssige Reaktionsgemisch fließt von oben in die Filtersäule. Dabei werden die Komponenten getrennt, indem die freie Phase im oberen Säulenabschnitt gebunden wird und die gebundene Phase, d.h. der zu messende Antigen/Antikörper/Komplex die Trennsäule durchläuft und auf den Boden des Probenröhrchens hinunter tropft und hier also extinktionsphotometrisch gemessen werden kann.

0807324

17.03.86¹³

-8-

Die Abschirmung 59 kann eingefärbt sein.

Fig. 3 zeigt eine Ausführungsform mit einer Meßküvette 66, die als Mikroküvette ausgebildet ist und, um auch für sehr kleine Mengen abgefilterter Flüssigkeit brauchbar zu sein, im unteren Bereich 68 eingeschnürt ist. Es ist interessant, daß die gleiche Säule 70 mit praktisch dem gleichen trichterartigen Boden 72, wie bezüglich Fig. 1 und 2 beschrieben, in diese Meßküvette paßt und einfach mit ihrem unteren offenen Ende 74 eingeschoben wird. In diesem Fall ist das Filtermaterial 76 eingepreßt in einer Kunststoffhülle 78, die dicht dem perforierbaren Boden 80 des trichterförmigen Reaktionsgefäßes anliegt. Das Reaktionsgefäß kann wieder durch einen Deckel 40 abgeschlossen sein. Ähnlich wie in Fig. 1 das untere Ende des Hüllrohres bildet hier die Mikroküvette das Meßgefäß, die Säule 70 das Reaktions- und Trenngefäß. Der Antigen/Antikörper/Komplex kann wieder photometrisch gemessen werden. In diesem Fall ist keine gesonderte Abschirmung vorgesehen, kann aber angeordnet werden. Es handelt sich bei der Mikroküvette um eine Konstruktion mit aus meßtechnischen Gründen besonders kleinem Boden 82.

Besonders für Automaten sind die Mikroküvetten 86 und 88 der Figuren 4 und 5 geeignet. Die Mikroküvette 86 bildet das Reaktionsgefäß, die Mikroküvette 88 der Fig. 5 das Meßgefäß.

Die Mikroküvetten können beispielsweise gruppiert in Racks angeordnet werden. Bei der Messung wird das Reaktionsgefäß dann immer übergangen und nur im Meßgefäß gemessen. Die beiden Gefäße sind durch dichtschließende steckbare Deckel 88 abgeschlossen. Die Mikroküvetten sind unten wieder eingeschnürt, um einmal gut in den Halter des Automaten zu passen, zum anderen, um auch kleinste definierte Volumina messen zu können, wie bei 90 zu sehen ist. Bei der Probenuntersuchung nach immunologischen Verfahren, besonders bei fluoreszenz-immunologischen Bestimmungen erfolgt nach bestimmtem Ablauf das Pipettieren der Reagenzien in die Mikroküvette 86 als Reaktionsgefäß. Nach Be-

8607324

17.03.87

-9-

endigung der Inkubationszeit wird das Reaktionsgemisch aspiriert und in der Meßküvette 88 auf den Filter gegeben. Wenn die Flüssigkeit den säulenförmigen Filter durchläuft, werden die Komponenten getrennt wie für Fig. 2 oder 3 beschrieben. Die Flüssigkeit auf dem Boden der Meßküvette enthält den Antigen/Antikörper/Komplex und kann photometrisch gemessen werden. Die Mikroküvette 88 kann die gleiche Form wie die Mikroküvette 86 der Fig. 4 haben. Beim Filter kann es sich um das gleiche Filtermaterial wie schon beschrieben und unten näher erläutert handeln. Das Filtermaterial wird hier in eine den Innenumfang der Mikroküvette 88 voll ausfüllende beispielsweise aus Kunststoff bestehende Hülse 94 gegeben.

Durch die Maßnahme nach der Erfindung erfolgt also die Reagenzienaufgabe oben in der beschriebenen chromatographischen Säule, im Mittelteil wird gefiltert und getrennt, unten wird gemessen.

Beim Säulenmaterial handelt es sich um ein trockenes Adsorptionsmittel aus unpolarem Material in Form eines homogenen verfilzten kreppförmigen und zu einer dichten Säule gerollten Filterpapiers mit hohem Reinheitsgrad. Das Filterpapier besteht aus reinem Linters mit einem Polymerisationsgrad von 2000 - 3000 oder aus Regeneratzellulose mit einem Polymerisierungsgrad von 800 - 3000 und ist frei von löslichen Stoffen. Das verwendete Filterpapier besitzt eine gleichmäßige Textur mit Poren in der Größenordnung von 1 - 14 μm und weist über der Höhe der Säule eine gleichmäßige Saugfähigkeit auf. Um die Bindungsaaffinität zu erhöhen, ist das Filterpapier mit Säuren, vorzugsweise Malein- oder Oxalsäure, ggf. auch mit Basen behandelt. Die Trennung erfolgt schnell und äußerst präzise durch das Zusammenwirken von Schwerkraft und Kapillarkräften. Die Auftrennung erfolgt überraschenderweise so, daß die niedermolekularen Bestandteile (freie Antigene und Antikörper) im oberen Säulenabschnitt, d.h. nach kurzer Laufzeit, gebunden werden, während die hochmolekularen Antigen/Antikörper/Komplexe ungebunden die Säule durchwandern. In Fig. 1, bei unten abgeschlossener Säule, verbleiben die Komplexe im unteren Säulenabschnitt. In Fig. 2 mit unten offener Säule ist der Komplex in der nach unten abtropfenden

0607324

17.03.86

-10-

Flüssigkeit enthalten. Vermutlich überwiegen bei dem verwendeten unpolaren Adsorptionsmittel van der Waals' und hydrophobe Wechselwirkungen, die das Wanderungsverhalten erklären können.

Bei allen Ausführungsformen können sämtliche Reagenzien mit Ausnahme der zu bestimmenden Substanz in der Säule lyophilisiert werden.

Die Ausführungsform nach Fig. 1 für radio-immunologische Bestimmungen enthält eine Metallabschirmung im oberen Filterabschnitt, so daß nur die Radioaktivität des unten befindlichen Antigen/Antikörper/Komplexes gemessen wird. Ähnlich enthalten die Ausführungsformen für fluoreszenz- oder lumineszenz-immunologische Untersuchungen (Fig. 2, 3, 5) eine Abschirmung aus Kunststoff um das säulenartige Filterpapier zur Vermeidung jeder Lichtreflexion.

8607324

17.03.86

-11-

Schließlich ist es, beispielsweise für Automaten, noch möglich, etwa durch gleichzeitiges Aufdrücken eine ganze Serie von Säulen zu perforieren. Dies kann beispielsweise von Hand oder über eine Platte geschehen. Hierzu könnte beispielsweise der Deckel mit langen spitzen Zacken versehen sein. Die Perforation würde bei Druck auf den Deckel erfolgen. Hier wäre es allerdings notwendig, die "Säule" ausreichend steif auszubilden. Der trichterförmige Boden der Säule wird im wesentlichen vorgeschwächt ausgebildet.

Durch die Maßnahme nach der Erfindung wird ein äußerst preiswertes präzises und umweltfreundliches Gerät für die üblichen immunologischen Verfahren zur Verfügung gestellt.

8607324

17.03.86

-12-

Beispiel (Bestimmung von Cortisol durch Chemilumineszenz-Immunoassay)

Zur Bestimmung des Cortisols im Serum werden die folgenden, alle zweckmäßig in einem Kit enthaltenen Reagenzien verwendet.

1. Antiserum. Das hochspezifische Antiserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Albumin (BSA)/Cortisol-3-(O-Carboxymethyl)-oxim-Konjugat gewonnen. Die Kreuzreaktion des Antiserums mit andern endogenen Corticosteroiden ist unbedeutend. Das an das endogene Transportprotein (CBG) gebundene Cortisol wird statt durch ein Deblockiermittel Merthiolat und ANS durch Verwendung von 0,1 mol/l Phtalat-Puffer pH 4,0 freigesetzt.
2. Als Tracer wurde Cortiso-e-Carboxymethyloxim (4-Aminobutyl-N-ethyl)-isoluminal (Cortisol ABEI) synthetisiert und im Phthalat-Puffer im Chemilumineszenz-Immunoassay verwendet.
3. Cortisol-Standards in Cortisol-freiem Humanserum, kalibriert mit der WHO First International Reference Preparation at Steroid Hormon. Ein Kit enthält 6 Standards mit folgenden Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{dl}$): 0, 1, 5, 10, 20, 50.
4. Trockene chromatographische Trennsäulen, die als Säulenmaterial ein gekrepptes Filterpapier von hohem Reinheitsgrad enthalten und mit organischen Säuren wie 0,1 N Maleinsäure behandelt und getrocknet wurden.
5. Als Katalysator wurde Mikroperoxidase/ H_2O_2 verwendet. Das Oxidationssystem Mikroperoxidase/ H_2O_2 hat sich als geeignet erwiesen: Hierbei liefert eine Mikroperoxidase-Konzentration von 3/ $\mu\text{mol}/\text{l}$ in 1,5 N NaOH bei einer H_2O_2 -Konzentration von etwa 0,1 % die besten Ergebnisse.

Testdurchführung

Zur Bestimmung einer unbekannten Menge von Cortisol werden zu Serumproben von 5 ~ 100 μl , vorzugsweise 10 μl , 0,1 ml Cortisol-Antikörper und 0,1 ml Tracer (Cortisol ABEI 10^{-7} molär) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 Minuten bei Raum-

0607324

18
17.03.81

-13-

temperatur bis zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichts inkubiert. Danach erfolgt die Trennung der gebundenen Phase, d.h. des Antigen-Antikörper-Komplexes von der freien Phase dadurch, daß der Boden des Reaktionsgefäßes mit einem Perforationskamm perforiert wird; danach fließt das Reaktionsgemisch von oben durch die trockene chromatographische Säule nach unten. Um die Trennung zu verbessern, werden nach dem Durchlauf noch 0,5 ml Wasser zugegeben. Es zeigt sich, daß im oberen Abschnitt der chromatographischen Säule die freie Phase gebunden ist, während sich die gebundene Phase in der Flüssigkeit mit Meßrörchen befindet.

Anschließend werden 200₁ ul NaOH 1,5 N sowie 100₁ ul Mikroperoxidase 5₁ u mol/l in das Meßrörchen pipettiert. Das Meßrörchen wird in die Meßkammer des Luminometers gebracht und die lichterzeugende Reaktion wird durch Injektion von 120₁ ul H₂O₂ 0,2 % intiiert. Die Fläche unter der Lichtintensitäts-Zeit-Kurve wird über eine vorgewählte Zeit integriert.

Testauswertung

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgt unter Verwendung einer Eichkurve aus 5 Standards. Zur Erstellung der Standard-Eichkurve wurde das gemessene Integral gegen die entsprechende Standard-Konzentration nach der Spline-Approximation-Standardkurve aufgetragen.

Der Mittelwert zur Bestimmung der Nachweiempfindlichkeit liegt bei 0,2 mg/dl Cortisol, d.h. Cortisol-Konzentrationen unter 0,3 mg/dl Cortisol können ebenfalls mit guter Reproduzierbarkeit gemessen werden. Die Bestimmung der Intercept-Werte gibt an, ob das Verhältnis der einzelnen Testkomponenten (Ag, Ak, markiertes Antigen) und die Diskriminierungsfähigkeit des Testsystems in einem idealen Bereich liegen. Die gefundenen Cortisol-Werte für den 90%- und den 50%-Interceptpunkt liegen mit 0,2 bis 1,3 mg/dl Cortisol bzw. 10 bis 20 mg/dl Cortisol im optimalen Bereich und verlaufen über den gesamten Meßbereich annähernd linear. Die relative Wiederfindung schwankt dabei zwischen 96 bis 104%.

0007321

17.01.82

-14-

Eine andere Möglichkeit, ein Verfahren gemäß der Erfindung durchzuführen, besteht darin (Fig. 6), mit einem Reaktionsgefäß 100 aus einem Material, wie vorher erwähnt, gegebenenfalls nach Aufsatz einer nicht dargestellten Kappe zu arbeiten. Nach der Reaktion im Gefäß 100 und nach Zugabe der markierenden Substanzen wird der Filter- und Trennteil 106 dicht an den Hals 102 des Reaktionsgefäßes gesteckt. Dichtungen 104 sind hierzu angedeutet. Es kann sich aber auch um jede andere formschlüssige gut abdichtende Verbindung handeln. In dem Trenn- und Meßteil 106 ist ein Filter 110 der vorbeschriebenen Art dicht eingepreßt. Die Pressung kann über nur angedeutete Rippen 112, die oben und unten vorgesehen sein können, vergrößert werden. Der Meß- und Trennteil ist hierbei durchgehend, d.h. es fällt der vorher erwähnte perforierbare Boden fort. Nach dem Aufstecken wird das Ganze um 180° gedreht (auf den Kopf gestellt). Die Lösung läuft durch das in oben beschriebener Weise vorpräparierte Filter durch. Die Messung erfolgt in vorbeschriebener Weise. Das Trennen von Kopf- und Bodenteil kann natürlich an einer anderen Stelle, beispielsweise nahe dem unteren Teil des Reaktionsgefäßes 108 oder an einer anderen zweckmäßigen Stelle vorgenommen werden.

Die Bereitstellung erfolgt vorzugsweise als Kit, enthaltend die chromatographische Säule sowie die üblichen bekannten Reagentien für ein bestimmtes Testverfahren, gegebenenfalls in abgemessenen Einheitsmengen.

Das Meßgerät kann hierbei auch wie die Mikroküvette der Fig. 5 (ohne zu perforierenden Boden) geformt und mit dem Reaktionsgefäß zusammensteckbar ausgebildet sein.

6607324

30

10.05.86

European Patent Attorneys

Dr. Müller-Boré und Partner • POB 260247 • D-8000 München 26

G 86 07 324.9

Deutsche Patentanwälte

Dr. W. Müller-Boré †

Dr. Paul Deufel
Dipl.-Chem., Dipl.-Wirtsch.-Ing.

Dr. Alfred Schön
Dipl.-Chem.

Werner Hertel
Dipl.-Phys.

Dietrich Lewald
Dipl.-Ing.

Dr. Ing. Dieter Otto
Dipl.-Ing.

Brit. Chartered Patent Agent

Peter B. Tunnicliffe

M.A. (Oxon) Chem.
G 3465 Lw/Ge

Dipl.-Chem. Dr.rer.nat. Armin Gilak

5309 Meckenheim-Merl

Chromatographische Säule für immunologische Untersuchungsverfahren

ANSPRÜCHE

1. Chromatographische Säule zum Separieren der Antigen-Antikörper-Komplexe von den freien, nicht an Antikörper gebundenen Antigenen und/oder zur vollständigen Bindung aller markierten Substanzen bei der immunologischen Bestimmung von Antigenen bzw. Haptenen nach radio-lumineszenz-fluoreszenz- oder enzym-immunologischen Bestimmungsmethoden, bei der in einer wasserfesten und wasserdichten Umhüllung als unpolares Säulenmaterial ein kreppförmiges dichtgerolltes Filterpapier mit hohem Reinheitsgrad, insbesondere aus Regeneratzellulose, eingepreßt ist,
dadurch gekennzeichnet, daß die chromatographische stehende Säule aus Filterpapier einen oberen von oben beaufschlagbaren Reaktionsteil (13) und einen unteren Trenn- und Meßteil (10; 32 bzw. 50; 56 bzw. 76; 78) aufweist, die durch einen perforierbaren

D-8000 München 2 POB 260247 Kabel: Telefon: Telecopier Infotec 8400 B
Isar torplatz 6 D-8000 München 26 Muebopat 089/22 14 03+7 G II + III (089) 22 90 43

Telex
524 285

00-06-000

-2-

Boden (16; 22 bzw. 58 bzw. 80) voneinander getrennt sind.

2. Chromatographische Säule nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule von unten dicht an den perforierbaren Boden der Säule herangesteckt ist.
3. Chromatographische Säule nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule oben und außen eine trichterartige Aufweitung (16;58;72) trägt, mit der sie in Klemmsitz unter den in der Form ähnlichen Boden der Säule gesteckt ist.
4. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule aus Filtermaterial in eine Kunststoffhülse eingepreßt ist, die gegebenenfalls von einer metallischen Hülse, insbesondere aus verzinktem Kupfer, umgeben ist.
5. Chromatographische Säule nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Filtermaterialteil der Säule von einem Material, insbesondere Kunststoff, als Paßteil zur Säuleninnenwand umhüllt ist, mit dem sie gegen den konischen bzw. trichterförmigen Boden der Säule geklemmt ist.
6. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule insgesamt mittels eines Paßkragens (36) an ihrem oberen Ende in ein Kunststoffreagenzrörchen dicht gesteckt ist.
7. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Filterteil der Säule insbesondere für photometrische Messungen,

0007324

200-006-000

-3-

gegen den Boden des Reaktionsteils abgeschirmt ist.

8. Chromatographische Säule nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die trichterartig aufgeweitete Abschirmung aus einem perforierbaren, insbesondere nach unten trichterartigen Boden besteht.
9. Chromatographische Säule nach einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die trichterartig aufgeweitete Abschirmung oben an dem ansteckbaren Filterteil mit den Boden von unten perforierenden scharfen Vorsprüngen ausgebildet ist.
10. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule durch einen Deckel verschließbar ist.
11. Chromatographische Säule nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Filtermaterialteil der Säule zur Erhöhung seiner Bindungsaffinität durch chemische Imprägnierungsmittel wie organische Säuren, insbesondere Maleinsäure oder Oxalsäure oder ggf. einer Base, präpariert ist.
12. Abänderung der chromatographischen Säule nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen unteren Reaktionsbehälter (100) mit aufsteckbarem Filter- und Meßteil (106), in welchem sich, dicht gepreßt, ein die Wandung dicht abschließendes, gegebenenfalls in einer Hülle sitzendes zur Erhöhung seiner Bindungsaffinität vorpräpariertes Kreppfiltermaterial (110) befindet, wobei die Säule für den Trenn- und Meßvorgang um 180° (auf den Kopf) verdrehbar bzw. stellbar ist.

8807324

00000000

- 4 -

13. Chromatographische Säule nach einem der Ansprüche 1 bis 11, mit Filter, in Automaten, dadurch gekennzeichnet, daß zwei unten geschlossene röhrenartige Mikroküvetten nebeneinander angeordnet sind, daß als Reaktionsgefäß ein Säulenäufsatz vorgesehen ist oder die Mikroküvette selbst als Reaktionsgefäß bei perforierbarem Deckel ausgebildet ist und auf der zweiten Mikroküvette ein Trenn- oder Meßäulen- aufsatz mit Säule aus Filterpapier vorgesehen ist oder das Filter allein in die zweite Mikroküvette eingesetzt ist.
14. Chromatographische Säule nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Reagenzien mit Ausnahme der zu bestimmenden Substanz bei tiefer Temperatur, insbesondere unter -20°C , lyophilisierbar ausgebildet sind.
15. Chromatographische Säule nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß bei gruppenmäßigem Einsatz der Mikroküvetten in Automaten alle Säulen durch einen einzigen Beaufschlagungsvorgang, insbesondere durch die menschliche Hand oder eine Platte, perforierbar ausgebildet sind.

8607324

68607324.9 24

02-06-86

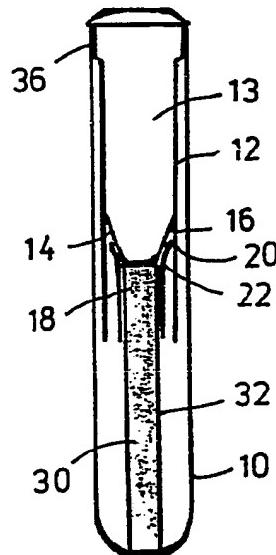


FIG. 1

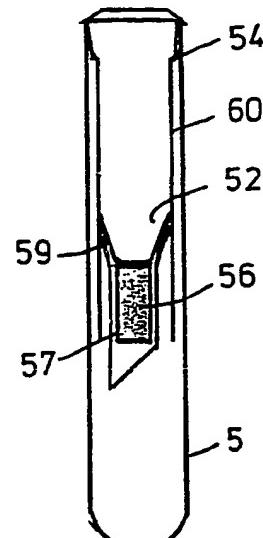


FIG. 2

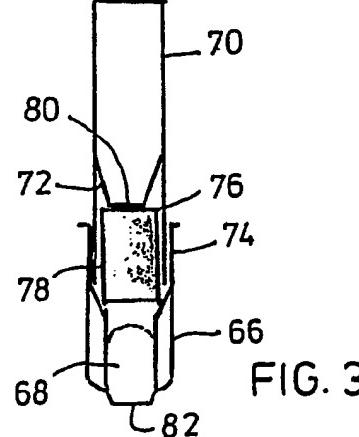


FIG. 3

1988
1988

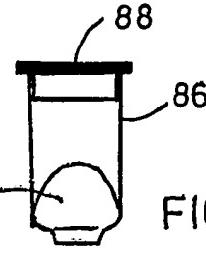


FIG. 4

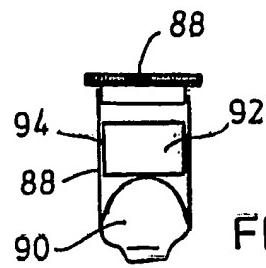


FIG. 5

0607324

02-014-36

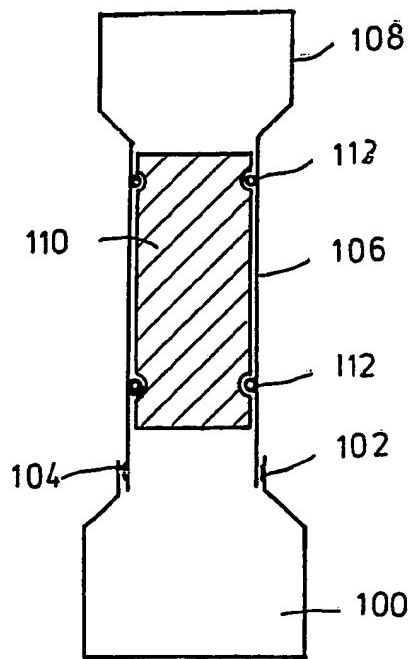


FIG. 6

8607324